



FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



EVALUACIÓN DE NUEVOS ADITIVOS FUNCIONALES BASADOS EN MICROALGAS
PARA ALIMENTACIÓN EN ACUICULTURA

DAVID SÁNCHEZ RUIZ

Puerto Real, a 13 de julio de 2020

TRABAJO FIN DE MÁSTER (PERFIL INVESTIGADOR)
MÁSTER UNIVERSITARIO EN ACUICULTURA Y PESCA

EVALUACIÓN DE NUEVOS ADITIVOS FUNCIONALES BASADOS EN MICROALGAS
PARA ALIMENTACIÓN EN ACUICULTURA

Memoria presentada por David Sánchez Ruiz para la obtención del
Título de Máster Universitario en Acuicultura y Pesca
(Perfil Investigador)



Fdo.: David Sánchez Ruiz

Puerto Real, a 13 de julio de 2020


TRABAJO FIN DE MÁSTER (PERFIL INVESTIGADOR)
MÁSTER UNIVERSITARIO EN ACUICULTURA Y PESCA

D. Juan Antonio Martos Sitcha, Profesor Ayudante Doctor (Doctor en Programa Oficial de Posgrado en Medio Marino: Ciencia y Desarrollo Sostenible por la Universidad de Cádiz), y Dña. Laura Bermúdez Villaescusa, Responsable de la Planta Experimental del Centro Tecnológico de la Acuicultura (CTAQUA), como Tutores del Trabajo Fin de Máster titulado “EVALUACIÓN DE NUEVOS ADITIVOS FUNCIONALES BASADOS EN MICROALGAS PARA ALIMENTACIÓN EN ACUICULTURA”, realizado por D. David Sánchez Ruiz,

INFORMAN: que el trabajo presentado en la presente memoria se ha llevado a cabo bajo nuestra tutorización en las dependencias del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz, y de la Planta Experimental del Centro Tecnológico de la Acuicultura (CTAQUA).

Y para que así conste firmamos el presente informe en Puerto Real, a 13 de julio de 2020.

Firma del/los Tutor/es



Fdo.: Dr. Juan Antonio Martos Sitcha



Fdo. Dña. Laura Bermúdez Villaescusa

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | I |
| ABSTRACT | II |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. LA EVOLUCIÓN DE LA ACUICULTURA | 1 |
| 1.2. IMPORTANCIA EN EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO Y LA EFICIENCIA DIGESTIVA | 2 |
| 1.3. USO DE NUTRACÉUTICOS EN LA ALIMENTACIÓN ACUÍCOLA: VALOR AÑADIDO PARA LOS PRODUCTOS ACUÁTICOS EUROPEOS GARANTIZANDO LA SOSTENIBILIDAD | 4 |
| 1.4. SALUD INTESTINAL, METABOLISMO Y ESTRÉS | 6 |
| 1.5. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LA DORADA | 7 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 10 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 11 |
| 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL | 11 |
| 3.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS | 13 |
| 3.3. ÍNDICES ZOOTÉCNICOS | 15 |
| 3.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS | 16 |
| 3.4.1. CORTISOL PLASMÁTICO | 16 |
| 3.4.2. METABOLITOS PLASMÁTICOS, HEPÁTICOS Y MUSCULARES | 17 |
| 3.4.3. ELECTROFISIOLOGÍA DEL EPITELIO INTESTINAL | 17 |
| 3.4.4. PERMEABILIDAD APARENTE DEL EPITELIO INTESTINAL | 19 |
| 3.5. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICO | 20 |
| 4. RESULTADOS | 21 |
| 4.1. RENDIMIENTO PRODUCTIVO Y PARÁMETROS BIOMÉTRICOS | 21 |
| 4.2. BIENESTAR ANIMAL Y METABOLISMO | 23 |
| 4.3. FISIOLÓGIA INTESTINAL | 25 |
| 5. DISCUSIÓN | 26 |
| 6. CONCLUSIONES | 32 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 33 |

RESUMEN

La acuicultura es una actividad con una creciente demanda que en las últimas décadas ha basado su desarrollo en la mejora de los procesos de alimentación, primando el crecimiento y la producción de biomasa. Sin embargo, en Europa este modelo ha fracasado y se está buscando dotar de valor añadido a sus productos. Una de estas vías es la sustitución de harinas y aceites de pescado en la alimentación acuícola por proteínas y grasas vegetales procedentes de microalgas aumentando la sostenibilidad del sector y confiriéndole compuestos nutraceuticos beneficiosos para mejorar la salud y bienestar animal, y/o la reducción del riesgo de enfermedad. El objetivo de este Trabajo de Fin de Máster ha sido determinar el potencial beneficio de la alimentación de juveniles de dorada (*Sparus aurata*) a medio-largo plazo con piensos suplementados con diferentes dosis y compuestos nutraceuticos comerciales extraídos de las microalgas. Para ello, durante 12 semanas se alimentaron ejemplares de dorada de ~12,5 g de peso inicial con 5 tratamientos diferentes, en triplicado: un pienso control, un pienso con el aditivo LB-GUThealth® con dos niveles de inclusión (0,5 y 1%) y un pienso con el aditivo LB-GREENboost® con dos niveles de inclusión (0,5 y 1%). Los resultados mostraron que incluso en el nivel de inclusión más bajo, estos compuestos no afectaron al crecimiento, aunque sí mejoraron la eficiencia alimentaria y los índices de conversión, reduciendo así la cantidad de pienso necesaria para producir una tonelada de dorada. Ambos compuestos produjeron niveles de lactato y cortisol menores a nivel plasmático, acompañado de una redistribución de los niveles de triglicéridos y de glucógeno. También indujeron, de manera dosis-dependiente, una elongación del tracto gastrointestinal, aumentando la superficie de absorción y haciéndola más selectiva y permeable. En conclusión, se ha comprobado que la suplementación con los compuestos nutraceuticos LB-GUThealth® y LB-GREENboost® en la dieta de dorada no afectó al crecimiento y a la supervivencia, aunque sí mejoró la eficiencia alimentaria, disminuyendo así los costes de producción. También se encontró que ejercen efectos positivos tanto a nivel metabólico como en la funcionalidad intestinal y el bienestar animal, confiriéndoles así un valor añadido con potencial para aumentar la competitividad del sector.

ABSTRACT

Aquaculture is an activity with a growing demand that in recent decades has based its development on the improvement of feeding processes, prioritizing growth and biomass production. However, in Europe this model has failed and is being sought to provide products with an extra value. One of these issues is related with the replacement of fishmeal and fish oils in aquafeeds by proteins and vegetable fats from microalgae, increasing the sustainability of the sector and improving health and welfare, as well as reducing the risk of disease. The aim of this study was to determine the potential benefit of feed supplementation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles in a medium-long term with different doses of commercial nutraceutical compounds extracted from microalgae. With this purpose, fish with ~12.5 g of initial body weight were fed for 12 weeks with 5 different treatments, in triplicate: i) a control feed, ii) the same formulation supplemented with two inclusion levels (0.5 and 1%) of the LB-GUThealth® additive, or iii) with the LB-GREENboost® additive also at two inclusion levels (0.5 and 1%). The results showed that even at the lowest inclusion level, these compounds did not affect growth, although they improved feed efficiency and conversion rates, thus reducing the amount of feed needed to produce a ton of fish. Both compounds produced lower lactate and cortisol levels at the plasma level concomitantly with a redistribution of triglyceride and glycogen levels. They also induced, in a dose-dependent manner, an elongation of the gastrointestinal tract, increasing the absorption surface and making it more selective and permeable. In conclusion, the supplementation with both nutraceutical compounds (LB-GUThealth® and LB-GREENboost®) in the gilthead sea bream has been shown to not affected growth and survival but improving feed efficiency, reducing production costs. They were also found to have positive effects both at the metabolic level and on intestinal functionality and animal welfare, giving them an extra value with potential to increase the sector's competitiveness.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La evolución de la acuicultura

La producción acuícola es una actividad creciente que se ha incrementado a nivel mundial en los últimos años debido tanto a un aumento en el consumo de pescado como a la disminución de la actividad pesquera, consecuencia de la sobreexplotación de los caladeros. Tras cuatro décadas de continuo crecimiento de la acuicultura, más de la mitad del pescado consumido en el mundo es abastecido por dicha actividad (APROMAR, 2019), y según datos de la FAO (Food and Agriculture Organization), en 2018 la producción acuícola mundial ascendió a 111,9 millones de toneladas de pescado destinado a consumo humano (FAO, 2018) (**Figura 1.1**).

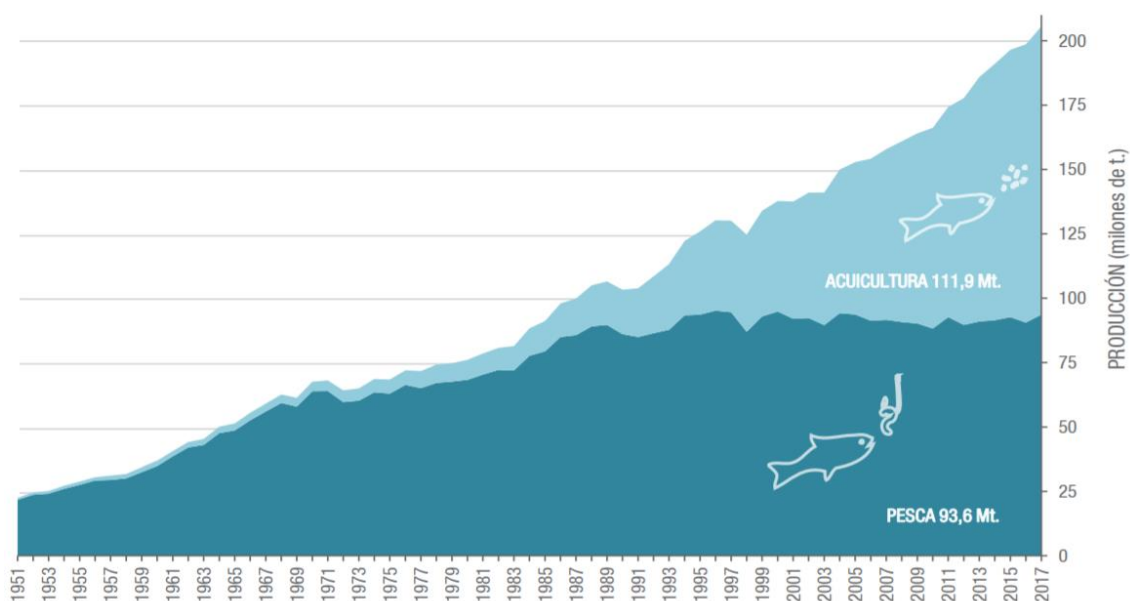


Figura 1.1. Evolución de la producción acuática mundial (acuicultura más pesca) en el periodo 1950-2017 (FAO, 2018)

Este crecimiento sigue siendo relativamente elevado gracias al aumento de la demanda de pescado para consumo entre la mayoría de los países productores, así como a la mejora en los procesos y técnicas de cultivo. Se estima que para 2100 la población mundial alcanzará los 11 mil millones de habitantes (Naciones Unidas, 2017), por lo que la demanda de productos acuáticos seguirá creciendo. Por tanto, esta creciente demanda debe satisfacerse incrementando la producción acuícola progresivamente, buscando la optimización de los cultivos, pero con el mínimo impacto medioambiental posible. En la Unión Europea (UE), la acuicultura es una

importante fuente de productos de origen acuático, tanto de procedencia marina como de aguas continentales. A nivel nacional, las especies de mayor volumen actual de producción acuícola son el mejillón, la lubina, la trucha arcoíris y la dorada respectivamente (APROMAR, 2019). Este estudio se centra en la dorada, especie muy apreciada por su carne y de fácil manejo en acuicultura, gracias a su gran plasticidad (Ortega, 2008), por lo que la hace ser clave en el sector acuícola nacional.

1.2. Importancia en el rendimiento productivo y la eficiencia digestiva

La alimentación en acuicultura, especialmente en peces, es un elemento clave para la viabilidad de su cultivo debido a que supone en torno al 50% de los costes totales de su producción (APROMAR, 2019). La optimización en la formulación y fabricación de piensos, junto con un mejor manejo de las prácticas de alimentación, puede reducir en gran medida la cantidad de alimento usado, y por tanto los costes correspondientes a este factor (FAO, 2018). Así, atendiendo a que el cultivo de especies acuáticas depende en su mayor parte de piensos formulados, su producción ha aumentado más del cuádruple en los últimos 20 años, pasando de utilizar 12 millones de toneladas de pienso a 51 millones de toneladas (FAO, 2018). Solo en España, en el 2018 se utilizaron 140.050 toneladas de pienso en acuicultura, siendo un 8,4 % superior que en 2017 (APROMAR, 2019). Por tanto, la gestión del proceso de alimentación por parte de las granjas acuícolas juega un papel clave no solo en cuanto a competitividad económica, sino también de sostenibilidad medioambiental. El pienso no consumido representa un alto porcentaje de materia orgánica e inorgánica en comparación con las excreciones metabólicas, llegando como efluentes al medioambiente, causando un incremento de nutrientes que puede dar lugar a problemas de eutrofización en zonas con bajas tasas de renovación de agua (bahías y estuarios), y ocasionando un impacto en los ecosistemas locales o regionales (Borja, 2002; Vergara et al., 2005; Fundación Observatorio Español de Acuicultura, 2014). Es por todo ello que una mejora en la eficiencia digestiva, atendiendo tanto a factores de pautas de alimentación, como a la composición y formulación de los ingredientes incorporados bien como componentes mayoritarios (proteína, carbohidratos, ácidos grasos, etc.) o como suplementos alimenticios (extractos de algas, pre- y pro- bióticos, entre otros) que puedan mejorar su aprovechamiento, se hace crucial en la gestión de la producción acuícola.

Por lo tanto, el estudio de diversos índices biométricos y de rendimiento productivo a lo largo del cultivo permite evaluar, desde un punto de vista objetivo y sencillo, la eficiencia y adecuación de las diferentes formulaciones y/o suplementaciones en la dieta. Entre ellos, podemos destacar los índices de eficiencia de alimentación o conversión del alimento (de sus siglas en inglés FE y FCR, respectivamente) de los cuales se puede extraer información sobre la cantidad de dieta requerida por unidad de ganancia de peso, es decir, la proporción de alimentos incorporados a los tejidos de los peces. Así, un FE o FCR óptimo en relación con el alimento aportado y su transformación en biomasa debería tender a una relación 1:1 (1 kg de pienso produce un aumento de 1 kg de biomasa), aunque los valores reales son muy variables dependiendo i) del tipo del alimento, ii) de las condiciones ambientales (temperatura del agua, fotoperiodo, estación), iii) del estadio de cultivo (larvas vs juveniles vs adultos), y iv) de la especie diana (Perera et al., 2019).

Muchos estudios se han enfocado en ajustar la composición de las dietas mediante determinación de la digestibilidad de diferentes ingredientes, o incluso evaluando la salud intestinal mediante diferentes técnicas, desde el clásico análisis histopatológico de los tejidos, hasta los más modernos análisis de transcriptómica y metabolómica, pasando por la evaluación electrofisiológica de la selectividad epitelial (e.g. Estensoro et al., 2016; Martos-Sitcha et al., 2018; Simó-Mirabet et al., 2018, entre otros). Como ejemplo de una especie marina de cultivo mediterráneo, el FE de la dorada (*Sparus aurata*) oscila entre el 0,5 y el 0,7 (Papaharisis y Avdelas, 2015), aunque estos valores pueden mejorar notablemente en condiciones experimentales (Bonaldo et al., 2010). Por lo tanto, existe margen para que los valores de eficiencia de alimentación ofrezcan unas mayores tasas específicas de crecimiento (SGR, % de crecimiento al día) de los peces cultivados bajo condiciones de producción. Como ejemplo, en los sistemas de producción actuales para el salmón atlántico (*Salmo salar*) en Noruega, el FCR ha disminuido de 2,8 a 1,2 kg de alimento para producir 1 kg de carne, llegando a ser una de las especies con mejores tasas de conversión de la piscicultura (Hasan y Soto, 2017). En este sentido, vale la pena señalar que una disminución de un solo decimal en este parámetro significará toneladas de ahorro en alimentación, y por lo tanto de reducción de desechos ambientales procedentes del sector acuícola.

1.3. Uso de nutraceuticos en la alimentación acuicola: valor añadido para los productos acuáticos europeos garantizando la sostenibilidad

Durante estas últimas décadas, el desarrollo de la acuicultura en general se ha centrado en la mejora de los procesos de alimentación en diferentes especies de importante valor comercial (*e.g.*, en estudios del salmón atlántico (*S. salar*): Sun et al., 2016; en lubina asiática (*Lates calcarifer*): Salama, 2008; en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*): Messina et al., 2014 y en dorada (*S. aurata*): Sánchez-Ruiz, 2018), primando el crecimiento y producción de biomasa sobre otros factores. Sin embargo, en Europa este modelo de desarrollo ha ocasionado el estancamiento del sector ante la imposibilidad de competir con otros países. Por tanto, ante el elevado crecimiento del sector a nivel mundial la actividad acuicola europea se ha visto forzada a reducir los costes de producción y a dotar de valor añadido a sus productos. Por este motivo, dos de sus mayores retos son: i) la salud y bienestar de los peces, y ii) lograr un modelo de negocio basado en la economía azul, mejorando el bienestar humano y reduciendo al mismo tiempo los riesgos ambientales y los daños ecológicos (Ivanova et al., 2017), consiguiendo una acuicultura más sostenible y respetada por el consumidor.

Uno de los principales problemas relacionados con la sostenibilidad del sector es la sustitución de harinas y aceites de pescado en la alimentación acuicola. Diversos estudios han proporcionado información sumamente importante en relación a la posibilidad de aumentar el uso de proteínas y grasas vegetales en los alimentos para peces, así como a la suplementación con diferentes aditivos que reviertan los efectos de detrimento epitelial y de rendimiento en la producción en muchos casos (Estensoro et al., 2016), haciendo que las tasas de inclusión de harina y aceite de pescado en los piensos acuicolas haya disminuido significativamente sin comprometer i) el crecimiento de los animales por un buen aprovechamiento de los nutrientes aportados en la alimentación al ajustarse a los requerimientos nutricionales de los organismos, ni ii) el valor nutricional de los productos acuáticos producidos (FAO, 2018). Así, durante los últimos años se ha logrado avanzar mucho consiguiendo reducir significativamente la dependencia de estos ingredientes marinos al incorporar mezclas equilibradas de harinas y aceites vegetales en las dietas comerciales (Mourete y Bell, 2006; Benedito-Palos et al., 2016; Simó-Mirabet et al., 2018; Perera et al., 2019), y se espera

conseguir tasas de reemplazo aún mayor mediante el uso de nuevas alternativas como los cultivos de semillas oleaginosas genéticamente modificadas y el uso de microalgas (Sprague et al., 2017). Aun así, todo este avance requiere de una importante labor de investigación para poder realizar dichas sustituciones y suplementaciones de manera segura y sin perjuicio del bienestar animal, como la que está suscitando el uso de compuestos nutraceuticos extraídos de las microalgas, como es el caso del presente Trabajo Fin de Máster.

Existen numerosas investigaciones donde se ha evaluado la inclusión de microalgas en la alimentación acuícola de diferentes especies, tanto dulceacuícolas en donde no se vio afectado el crecimiento (Kumar et al., 2004; Olvera-Novoa et al., 1998) o incluso indujeron efectos positivos (Sarker et al., 2016) , como en salmónidos y especies marinas, donde en función del nivel de inclusión y de la especie de microalga utilizada se obtuvieron resultados más dispares (*e.g.*, en salmónidos, Kiron et al. 2016; Gong et al., 2019; Sorensen et al., 2016 y en dorada, Palmegiano et al. 2009; Eryalçin et al., 2013; Eryalçin y Yildiz, 2015).

Por tanto, el uso de las microalgas en la elaboración de piensos, tanto en su totalidad como tras su tratamiento biotecnológico para una mayor biodisponibilidad de los compuestos nutraceuticos que contienen, actualmente está promoviendo un gran interés, no solo por su elevado contenido en proteínas (López et al., 2010), aminoácidos esenciales y ácidos grasos poliinsaturados (Huerlimann et al., 2010), sino también por la presencia de otros compuestos que les confieren un papel adicional como ingrediente funcional. La definición de “alimento funcional” engloba a todo aquel que posee un efecto beneficioso demostrado, sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo este hecho relevante para mejorar la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermedad (ILSI, 1999). Por ello, el diseño de dietas para la alimentación acuícola se va encaminando, además de en proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo, en proporcionar ingredientes funcionales que mejoren el estado de salud (Burr et al., 2005), teniendo en cuenta que el estado nutricional y el estrés van a influir en su estado inmunológico (Jensen et al., 2015).

De hecho, ya existen estudios que describen efectos positivos sobre el crecimiento y utilización del alimento, la coloración y estado oxidativo del músculo, la funcionalidad y estructura intestinal, la respuesta al estrés, y la resistencia a enfermedades, como es el caso de la inclusión de *Isochysis galbana* en la dieta (4-5%) de *Trachinotus ovatus*: He et al., 2018). Sin embargo, estos estudios sobre la inclusión de microalgas en dietas funcionales en acuicultura aún son escasos en comparación con otras especies del sector pecuario. En base a esto, la utilización de las microalgas como ingrediente funcional a un nivel de inclusión relativamente bajo (<10%) se está contemplando como una estrategia prometedora para mejorar el crecimiento, metabolismo y estado de condición general de los peces cultivados (Chakraborty y Hancz, 2011).

1.4. Salud intestinal, metabolismo y estrés

Atendiendo a todo lo anteriormente expuesto, el mantenimiento de la salud intestinal de los animales es de suma importancia durante el proceso de cultivo, dado que la presencia de un intestino sano permitirá una correcta funcionalidad de los procesos de absorción y asimilación de los nutrientes ingeridos, lo que repercutirá positivamente sobre el crecimiento y el bienestar animal de los peces. En este sentido, el intestino puede ser considerado como un órgano muy interesante dada i) su polaridad debida a la distribución de proteínas y transportadores a lo largo de las membranas basolateral y apical del mismo, y ii) por la permeabilidad/impermeabilidad frente a determinados compuestos debido a las uniones existentes entre las membranas celulares del epitelio. Todo ello determinará la selectividad intestinal, por lo que el estudio de la capacidad eléctrica establecida por el potencial activo de transporte y su permeabilidad permitirá la caracterización del impacto de determinados compuestos, tales como el de diferentes aditivos y la inclusión de diferentes materias primas, con relación a la integridad y funcionalidad del epitelio intestinal (Estensoro et al., 2016).

En peces, los nutrientes asimilados a través del epitelio intestinal procedentes de la dieta, como los carbohidratos, lípidos y proteínas, sirven como fuente para la producción de energía y soportar así la realización de diferentes funciones fisiológicas, desde la maduración sexual en periodos de reproducción, la supervivencia y respuesta ante una situación de estrés, o invertirlo directamente en crecimiento (biomasa)

cuando las condiciones de cultivo son las más favorables para los animales. Es por ello que el estudio del metabolismo intermediario de los animales sobre el posible control que pueda ejercer i) la formulación de la dieta y ii) las variables ambientales sobre el equilibrio dinámico de los procesos energéticos involucrados en el anabolismo (formación de estructuras complejas a partir de metabolitos más sencillos procedentes, en su mayoría, de la alimentación y la nutrición) y el catabolismo (movilización de reservas energéticas para su uso, por ejemplo, ante situaciones adversas) sea de suma importancia para tener en todo momento una estima del bienestar animal de los ejemplares cultivados debido a los requerimientos nutricionales de cada especie y a las formulaciones ofrecidas durante su cultivo (Ellis et al., 2012). Así, no es de extrañar que el estudio de las principales rutas metabólicas, con la medición de diversos sustratos energéticos disponibles en diferentes tejidos (a modo de reserva) o circulantes en el plasma de los animales, sea una aproximación válida para la evaluación de dietas funcionales en animales cultivados.

De igual modo, y dado a que los procesos de estrés durante condiciones desfavorables pueden suponer, tanto por causas nutricionales como por el propio manejo y sistema de cultivo, la movilización de las reservas energéticas a corto y largo plazo (Martos-Sitcha et al., 2014), el estudio del principal eje endocrino encaminado a hacer frente a un reto durante el proceso de cultivo, como es el eje Hipotálamo-Hipofisario-Interrenal (HHI), con el cortisol como producto final y como una de las hormonas más importantes para su regulación, también dará indicios sobre la idoneidad de determinados compuestos en la dieta que actúen como agentes preventivos relacionados con el bienestar animal de los animales cultivados (Saccol et al., 2018).

1.5. Características biológicas de la dorada

La dorada (*Sparus aurata* Linneo, 1758) es un teleósteo marino de la familia de los espáridos que se distribuye por todo el Mediterráneo, así como por las costas orientales del Océano Atlántico (Reig, 2001). Esta especie recibe su nombre por la banda dorada que se extiende entre sus ojos, visible cuando los individuos llegan a la fase adulta (**Figura 1.2**).



Figura 1.2. Boceto de una dorada, *Sparus aurata* (tomada de conxemar.com/es)

A pesar de ser una especie gregaria, pueden vivir en solitario o formando pequeños grupos. Su alimentación es principalmente carnívora, basándose en bivalvos (almejas, mejillones y ostras), peces o incluso cefalópodos, aunque también pueden ser herbívoros facultativos. Es una especie demersal (bentónica-pelágica) que habita principalmente en el litoral, desde la zona superficial hasta los 90 metros de profundidad (Reig, 2001). Es una especie eurihalina y euriterma soportando amplios rangos de variación en la salinidad y la temperatura ambiental pudiendo emigrar hacia las desembocaduras de los ríos y lagunas litorales en primavera, para buscar mejores condiciones de alimentación, buscando zonas de mayor profundidad a mediados de otoño, donde las condiciones son menos extremas que en las lagunas costeras (Audouin, 1962). También pueden encontrarse refugiadas en praderas de angiospermas marinas costeras (Verdiell-Cubedo et al., 2007).

Una de las características a tener en cuenta de esta especie en su cultivo es que presenta un hermafroditismo protándrico, actuando como macho en los primeros años hasta alcanzar 20-30 cm, sufriendo posteriormente una inversión sexual hacia hembras en el 80 % de los casos en función de la relación machos:hembras presente en el cultivo, y siempre tras la primera maduración sexual. La dorada es la única especie de su familia que se cría a gran escala y se ha convertido actualmente en una de las principales especies cultivadas a nivel europeo. En el Mediterráneo se concentra el 90% de la producción mundial, repartida entre Grecia, Turquía, España e Italia respectivamente (Zohar et al., 1995; Ortega, 2008; APROMAR, 2019). La dorada es una especie pionera en la acuicultura de peces marinos, siendo objeto de un gran esfuerzo

de investigación sobre reproducción, ontogenia, crecimiento y nutrición durante más de cuatro décadas (Pavlidis y Mylonas, 2011). Además, existen un amplio número de estudios sobre su fisiología, metabolismo y nutrición ante diferentes condiciones de cultivo (*e.g.* Estensoro et al., 2016; Martos-Sitcha et al., 2018, 2019; Perera et al., 2019), sugiriéndose a esta especie como un buen modelo de estudio para la acuicultura.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El desarrollo de una acuicultura sostenible depende del mantenimiento de las condiciones adecuadas para maximizar el crecimiento y el bienestar de los peces, ya que condiciones desfavorables podrían ocasionar una reducción en el rendimiento y la salud de los mismos. De este modo, existen estrategias que se han venido estudiando con el propósito de evitar pérdidas económicas relacionadas con problemas de nutrición y estrés. Por este motivo, la *hipótesis de trabajo* del presente estudio pretende verificar la capacidad de mejora en cuanto a la eficiencia de alimentación, y en consecuencia del rendimiento productivo, en juveniles de dorada (*S. aurata*) mediante la adición de extractos procedentes de las microalgas en la dieta.

Así, el **objetivo general** de este Trabajo Fin de Máster es determinar el potencial beneficio de la alimentación de juveniles de *S. aurata* a medio-largo plazo con piensos suplementados con diferentes dosis y compuestos nutracéuticos comerciales extraídos de las microalgas.

Para alcanzar el objetivo general planteado, se plantea abordar los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Valorar la influencia de diferentes compuestos nutracéuticos adicionados en la dieta a dos dosis diferentes de inclusión (0,5 y 1%) sobre la eficiencia de alimentación y rendimiento productivo de la especie.
- 2) Comparar la orquestación metabólica y bienestar animal de dichos ejemplares bajo condiciones normales de cultivo.
- 3) Evaluar la salud intestinal de los animales mediante técnicas de selectividad epitelial y permeabilidad del intestino.
- 4) Calcular el potencial beneficio económico del uso de estos compuestos nutracéuticos en la formulación de piensos comerciales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

La especie seleccionada para este experimento fue la dorada (*S. aurata*) debido a su gran interés tanto para la acuicultura andaluza como para la española y europea. Se utilizaron un total de 450 ejemplares obtenidos de fuentes comerciales con un peso medio de ~12,5 g. Los peces fueron distribuidos aleatoriamente en 15 tanques de 100 L de capacidad ($n = 30$, densidad de cultivo aproximada de 4 Kg/m³) en las instalaciones del Centro Tecnológico de Acuicultura de Andalucía (CTAQUA) localizado en El Puerto de Santa María (Cádiz). Durante todo el periodo experimental, los animales se mantuvieron a salinidad (37,7‰) y temperatura (22 ± 1 °C) constantes, así como bajo condiciones de fotoperiodo natural del 25 de febrero hasta el 23 de mayo de 2019 para la latitud geográfica de la bahía de Cádiz, España (36° 31' N y 6° 12' W) y apoyado con un sistema de luminarias con fotoperiodo establecido de 12L/12O. Los tanques experimentales se mantuvieron mediante un sistema de recirculación (RAS, por sus siglas en inglés) provistos con filtración tanto mecánica (perlón y *skimmer*) como biológica (biobolas y *bioblocks*) (**Figura 3.1**).



Figura 3.1. Foto de los tanques experimentales y el sistema de recirculación (CTAQUA) (foto: David Sánchez)

Con el objetivo de evaluar los dos nuevos aditivos funcionales basados en microalgas (LB-GUThealth® y LB-GREENboost®) en diferentes dosis de inclusión, se llevó a cabo 5 tratamientos diferentes, en triplicado, durante un periodo de 12 semanas (87 días) (**Figura 3.2**), donde se utilizó un pienso control sin la incorporación de los compuestos

de microalgas, así como 4 piensos experimentales, de formulación similar al control, pero suplementadas con los productos de *Lifebioencapsulation*:

- Pienso **control (CTRL)**, basado en la formulación de un pienso estándar para dorada, sin aditivos funcionales (*e.g. Skretting*).
- Pienso con aditivo **LB-GUThealth® (LB_{Gh})**, con dos niveles de inclusión diferentes: 5 g y 10 g de producto/kg de pienso control (0,5% y 1%) (**LB_{Gh0.5}** y **LB_{Gh1}**, respectivamente).
- Pienso con aditivo **LB-GREENboost® (LB_{Gb})**, donde también se utilizaron dos niveles de inclusión: 5 g y 10 g de producto/kg de pienso control (0,5% y 1%) (**LB_{Gb0.5}** y **LB_{Gb1}**, respectivamente).

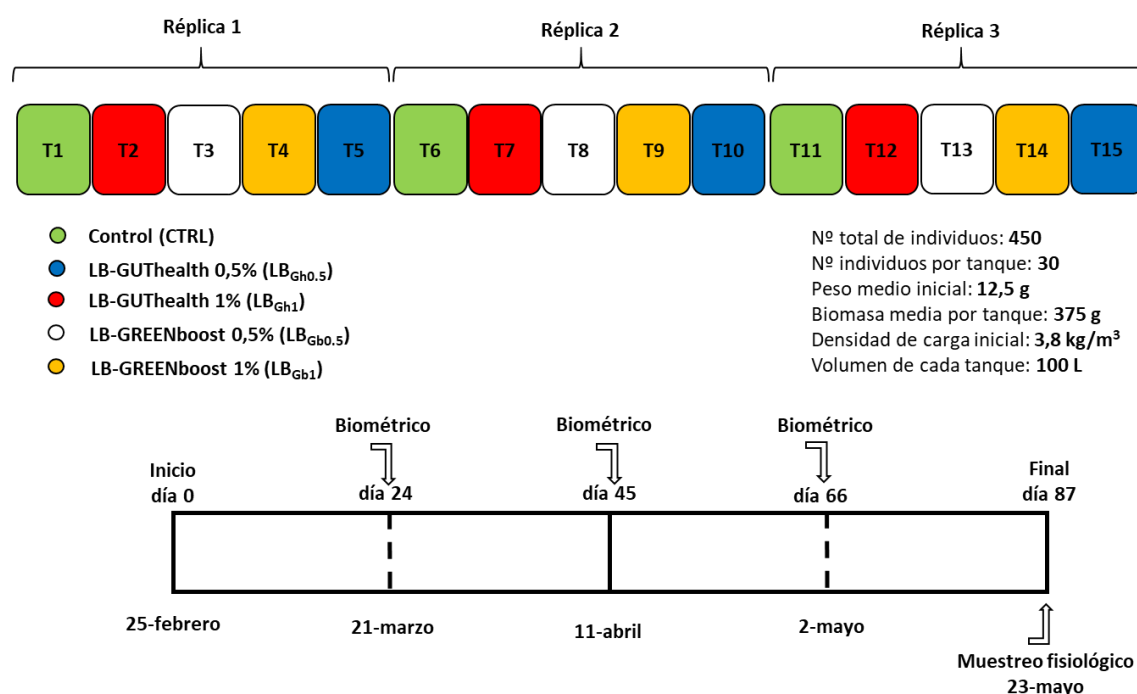


Figura 3.2. Esquema del diseño experimental para la evaluación de los productos *Lifebioencapsulation* en dorada.

La prueba de alimentación fue realizada “a ciegas”, de tal forma que los cinco piensos fueron etiquetados con un color diferente para cada uno de ellos, asignándose de forma aleatoria a cada uno de los tanques experimentales. Por tanto, el personal encargado de alimentar cada una de las unidades experimentales no supo qué color correspondía con cada pienso, eliminando cualquier fuente de subjetividad durante el proceso de alimentación para la obtención de resultados finales objetivos en cuanto a la aceptación y rendimiento productivo de cada una de las dietas ofrecidas.

La alimentación se distribuyó en 3 dosis diarias *ad libitum* (hasta saciedad aparente), asegurándose que la cantidad ofrecida en cada unidad experimental fuese ingerida en su totalidad según demanda, para disminuir los errores en los distintos índices y parámetros zootécnicos calculados con posterioridad. Así, la ingesta de cada unidad experimental fue contabilizada de forma diaria, permitiendo obtener la ingesta total para el cálculo de la eficiencia de alimentación. Para ello, cada 3 semanas aproximadamente, todos los animales de cada una de las unidades experimentales fueron anestesiados con una dosis de 0,1 ml de 2-fenoxietanol/L de agua de mar, realizándose un muestreo biométrico para obtener la evolución y seguimiento del crecimiento para cada uno de los piensos experimentales. Durante todo el periodo experimental, el mantenimiento de cada uno de los tanques experimentales, así como del sistema RAS, se llevó a cabo a diario de forma minuciosa, contemplando la eliminación de algas y materia orgánica adheridas a las paredes de los tanques o el mantenimiento del perlón filtrante y el *skimmer* para mantener unas condiciones óptimas en el agua del cultivo. Además, aprovechando la extracción de los peces durante los muestreos biométricos intermedios, se realizaba una limpieza exhaustiva y desinfección del interior de cada uno de los tanques evitando así el estrés diario producido por su manipulación.

3.2. Obtención de muestras

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo siguiendo las directrices dadas por el Consejo de la Unión Europea (2010/63/UE), legislación española (ley 32/2007 y RD 53/2013) y la Universidad de Cádiz para el uso de animales de laboratorio. Además, el presente modelo experimental cuenta con la aprobación de la Junta de Andalucía para el uso y manipulación de animales de experimentación, con el número de autorización 04/04/2019/056.

Transcurridos 3 meses de alimentación, 4 ejemplares por tanque ($n = 12$ peces/tratamiento) fueron anestesiados con una sobredosis letal de 1 mL de 2-fenoxietanol/L de agua de mar. Tras pesarlos y medirlos de forma individual, se obtuvieron muestras de sangre mediante punción del pedúnculo caudal utilizando jeringas de 1 mL previamente heparinizadas para evitar su coagulación (**Figura 3.3**).



Figura 3.3. Proceso de extracción de sangre a un ejemplar de dorada durante el muestreo fisiológico final (Foto: David Sánchez)

Dichas muestras fueron recogidas en tubos Eppendorf de 1,5 mL y centrifugadas durante 5 minutos a 13.000 g para la obtención del plasma sanguíneo, el cual fue alicuotado en tubos de Eppendorf de 0,5 mL, congelados en nitrógeno líquido y almacenado a -80 °C hasta el posterior análisis en el laboratorio.

De cada animal sacrificado se obtuvo el peso total del hígado, utilizado para el cálculo del **índice hepatosomático (IHS)** a partir de la fórmula:

$$IHS = \left[\frac{\text{peso del hígado (g)}}{\text{peso total del animal (g)}} \right] * 100$$

Posteriormente, el tejido se dividió en 2 mitades para ser congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su posterior homogenización y análisis en el laboratorio. Además, tras desescamar y eliminar la piel del lomo izquierdo de cada uno de los animales, se tomaron muestras de músculo mediante el uso de un bisturí, las cuales fueron igualmente depositadas en tubos de 2 mL para su congelación en nitrógeno líquido y almacenamiento a -80 °C hasta su posterior homogenizado y análisis en el laboratorio. Por último, se extrajo la totalidad del intestino para su medición, desde los ciegos pilóricos hasta el recto (**Figura 3.4**), y el posterior cálculo del **índice de longitud del intestino (ILI)** según la fórmula:

$$ILI = \left[\frac{\text{longitud del intestino (cm)}}{\text{longitud furcal (cm)}} \right] * 100$$

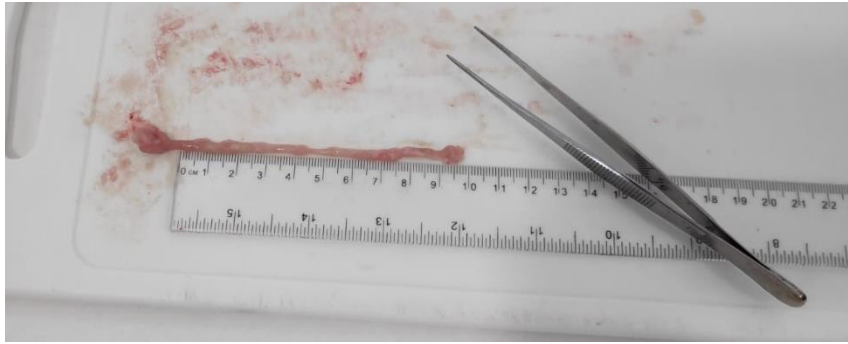


Figura 3.4. Disección del intestino completo, desde el final de los ciegos pilóricos (izquierda) hasta el recto (derecha). (Foto: David Sánchez)

Además, una semana después del muestreo final, tiempo suficiente para garantizar una alimentación apropiada para los animales tras su manipulación para la biometría final, se tomaron 2-3 peces por tanque ($n = 8$ peces/tratamiento) para analizar la permeabilidad y selectividad del epitelio mediante técnicas electrofisiológicas *ex vivo*. Para ello, los animales fueron anestesiados con una sobredosis letal de 1 mL de 2-fenoxietanol/L de agua de mar y los intestinos anteriores montados según lo descrito en el apartado **3.4.3**.

3.3. Índices zootécnicos

Los datos biométricos obtenidos durante el muestreo final se utilizaron para examinar la evolución del crecimiento en peso (g) y longitud furcal (cm) de todos los ejemplares muestreados, además de los siguientes índices zootécnicos y morfométricos calculados a partir de las siguientes expresiones (Millán-Cubillo et al., 2016):

- **Factor de Condición de Fulton (CF):** expresa la relación volumétrica en función del peso.

$$CF = \frac{[peso(g)*100]}{(longitud\ total)^3}$$

- **Ganancia de peso (WG):** expresa la evolución del peso de los ejemplares respecto al peso inicial de los mismos (%).

$$WG = \left[\frac{peso\ húmedo\ final(g) - peso\ húmedo\ inicial\ (g)}{peso\ húmedo\ inicial\ (g)} \right] * 100$$

- **Tasa específica de Crecimiento (SGR):** se define como la variación del peso corporal a lo largo del tiempo (%/día).

$$SGR = \left[\frac{\ln \text{peso húmedo final (g)} - \ln \text{peso húmedo inicial (g)}}{\text{tiempo (días)}} \right] * 100$$

- **Eficiencia de alimentación (FE):** es la relación existente entre el aumento del peso de los animales respecto al alimento ingerido de forma voluntaria hasta saciedad aparente (*ad libitum*).

$$FE = \left[\frac{\Delta \text{biomasa (g)}}{\text{consumo alimento seco (g)}} \right]$$

3.4. Técnicas de análisis

Todas las técnicas de análisis aquí descritas, a excepción de la electrofisiología, se basan en reacciones colorimétricas que dan lugar a un compuesto a partir del cual podemos determinar su concentración mediante la lectura de absorbancias en un espectrofotómetro de microplacas (PowerWave™ 340 de BIO-TEK) y calcular su concentración a partir de elaboración de curvas estándar con el uso de patrones de concentración conocida en cada uno de ellos. Las lecturas tomadas en microplacas de 96 pocillos se procesaron con el software KC Junior™ de BIO-TEK, cuyos resultados se exportaron a Excel para el posterior tratamiento de datos. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

3.4.1. Cortisol plasmático

El análisis de los niveles de cortisol plasmático se realizó a partir del kit comercial Cortisol Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays, K003-H1W), siguiendo las recomendaciones del fabricante. De forma resumida, se empleó una placa de 96 pocillos tapizada con un anticuerpo primario en la que se añadieron 50 µL de cada uno de los estándares y de las muestras de plasma, en duplicado, así como 25 µL de cortisol conjugado (en todos los pocillos) y 25 µL de anticuerpo secundario específico contra cortisol (excepto en los 4 que actuarían como blanco, sustituyéndose por 25 µL de buffer). Posteriormente, la placa sellada con film autoadhesivo se incubó durante 1 hora a 25 °C con agitación constante (150 rpm/min). Transcurrido este tiempo, la placa fue introducida en un lavador de microplacas (Automatic Micro-plate Washer PW-812, Huisong, Shanghai, China), y tras su secado se añadió 100 µL de tampón TMB en todos los pocillos para volver a proceder a su incubación durante 30 min a 25 °C sin

agitación. Finalmente, se añadieron 50 µL de Stop Solution y se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm.

3.4.2. Metabolitos plasmáticos, hepáticos y musculares

Las muestras hepáticas y musculares fueron homogenizadas previamente antes del análisis de metabolitos. Para el homogenizado, se realizó una desproteinización a partir de una relación 7,5 v/w de una solución de ácido perclórico 0.024 N (Merck KGaA, 1.00518.1001), homogenización mediante instrumento de dispersión de alto rendimiento (T 25 digital Ultra-Turrax®) y su posterior neutralización con una solución básica de bicarbonato potásico 1 M (Merck KGaA, 1.04854.0500), resultando una dilución 15 veces el peso del tejido. Tras mezclarlo en el agitador tipo vortex, cada uno de los homogenizados se centrifugaron durante 30 minutos a 3.250 g y 4 °C, distribuyendo posteriormente en alícuotas la fase acuosa resultante, en la que quedaron suspendidos los metabolitos objeto de medición.

Usando kits comerciales de SpinReact (SpinReact SA, Sant Esteve d'en Bas, Girona, España), y mediante la adaptación de los protocolos a microplacas de 96 pocillos, los parámetros metabólicos que fueron analizados tanto en plasma, hígado y/o músculo incluyeron: i) los niveles de glucosa (Glucose-HK Ref. 1001200), ii) los niveles de lactato (Lactate Ref. 1001330) y iii) los niveles de triglicéridos (TAG Ref. 1001311). Para el caso de la medición de proteínas plasmáticas se utilizó el método del ácido bicinconínico con el kit de proteínas BCA (BCATM Protein assay kit, Pierce, Rockford, EE.UU.) con el estándar de albumina procedente de suero bovino. Para el caso del glucógeno hepático y muscular se utilizó el método descrito por Keppler y Decker (1974). Así, una vez obtenida la glucosa total almacenada después de la ruptura del glucógeno, y tras restar los niveles de glucosa libre en el tejido hepático, fue posible la determinación de este metabolito de almacenamiento con el kit específico de SpinReact (Glucose-HK Ref. 1001200) siguiendo el mismo procedimiento espectrofotómetro descrito anteriormente.

3.4.3. Electrofisiología del epitelio intestinal

Las muestras de intestino de animales sacrificados según lo descrito anteriormente, fueron tomadas, aisladas, abiertas longitudinalmente y lavadas con solución

basolateral de composición química/iónica similar a la del plasma de la especie (NaCl 140 mM; MgSO₄ 1,5 mM; NaH₂PO₄ 3 mM; CaCl₂ 1,5 mM; NaHCO₃ 5 mM; KCl 3 mM; Glucosa 5,5 mM; Na-Hepes 5 mM), osmolaridad ajustada a 290 mOsm/Kg con manitol y pH de 7,80. Posteriormente los tejidos fueron montados según los descrito por Gregório et al. (2013). De forma resumida, el tejido fue rápidamente situado en un inserto de 0,25 cm², el cual sirvió para separar/aislar como membrana semipermeable a los dos compartimentos de las cámaras de Ussing, conteniendo 2. mL de una solución salina fisiológica basolateral (**Figura 3.5**).



Figura 3.5. Tejido epitelial intestinal colocado en una de las caras del inserto donde se fija el epitelio para su posterior introducción en las cámaras de Ussing (Foto: David Sánchez)

Durante el ensayo, el tejido fue aireado bilateralmente con una mezcla de gas compuesta por 0,3% de CO₂ + 99,7% de O₂ y mantenido a una temperatura constante de 22 °C para asemejar el ensayo *ex vivo* a las condiciones *in vivo* de cultivo. El potencial transepitelial (V_t, en mV) fue referenciado como el lado de mucosa apical y la corriente de cortocircuito (I_{sc}, en μA/cm²) fue monitorizada manteniendo el voltaje del epitelio a 0 mV y expresado como negativo para la absorción de iones.

La resistencia epitelial (R_t, en Ω/cm²) fue calculado de acuerdo con:

$$\text{Ley de Ohm: } R = \left[\frac{\text{potencial transepitelial (V}_t\text{)}}{\text{corriente de cortocircuito (I}_{sc}\text{)}} \right]$$

Para el cálculo de la resistencia epitelial se usaron interferencias de corriente inducidas por pulsos de ±1 mV sostenidos durante 3 segundos por minuto. Todos los parámetros bioeléctricos de cada tejido fueron monitorizados por medio de electrodos Ag/AgCl conectados a cada lado de las cámaras de Ussing con un registro de datos en continuo durante 90 minutos tras lograr la estabilidad de cada uno de los tejidos, 30-40 minutos después del montaje en las cámaras. La corriente de cortocircuito y los pulsos fueron

representados mediante el uso de un amplificador DVC1000 (World Precision Instruments, Sarasota, USA) y almacenadas en un PC usando un sistema de adquisición de datos (LabTrax, World Precision Instruments, Sarasota, EE.UU.) (**Figura 3.6**).

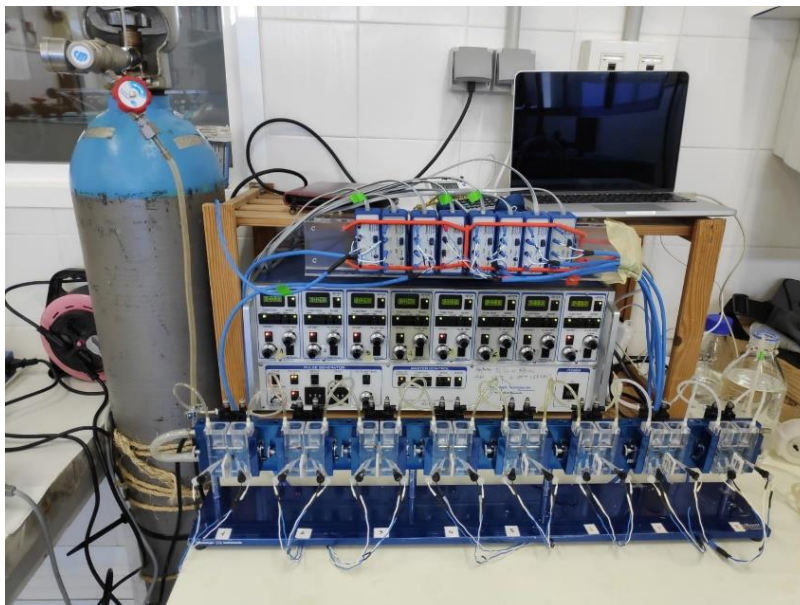


Figura 3.6. Equipo de electrofisiología portátil que se usó en este estudio, conectado a 8 cámaras de Ussing para la medición de los diferenciales de potencial a través de los tejidos intestinales que separan dos cámaras con la misma solución salina (Foto: David Sánchez)

3.4.4. Permeabilidad aparente del epitelio intestinal

Aprovechando los tejidos montados en cámaras de Ussing para la obtención de datos electrofisiológicos, se analizó la permeabilidad aparente del intestino anterior. Así, 30 minutos tras la estabilización de los epitelios en las condiciones *ex vivo*, la solución basolateral de cada una de las cámaras fue reemplazada con 2 mL de solución nueva y limpia a la cual se le aplicó, solamente en la cara apical (lumen) del tejido, el compuesto FITC-dextrán de 4.000 mol de peso medio (Fluorescein isothiocyanate–dextran, Ref. 46944, Sigma, España) a concentración final de 0,5 mg/mL (**Figura 3.7**). Sesenta minutos tras su aplicación, una alícuota de la solución contenida en cada una de las cámaras correspondientes a la cara apical (donante) y basolateral (receptor, correspondiente a la zona de contacto con los vasos sanguíneos) fue recogida y almacenada a -20 °C hasta su posterior análisis en laboratorio utilizando un fluorímetro Multi-Mode Microplate Reader BioTek Synergy™ 4 (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE.UU.) mediante excitación a longitud de onda de 492 nm y emisión a

520 nm. Finalmente, la **permeabilidad aparente (Papp)** fue calculada según la expresión:

$$Papp = \left[\frac{V \cdot dC}{A \cdot C_0 \cdot dT} \right]$$

En donde V es el volumen de la cámara receptora (basolateral, 2 mL), A es el área de absorción (0,25 cm²), C₀ es la concentración inicial de la cámara donante (apical, 0,5 mg/mL), y dC/dT es la tasa de cambio de concentración (ng/s) en relación al tiempo de incubación (60 min) de FITC-dextrán en la cámara receptora con respecto a la solución basolateral antes del comienzo de la incubación.

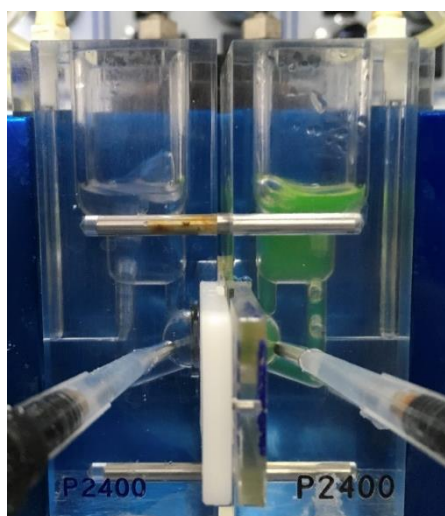


Figura 3.7. Cámara de Ussing donde se ha incorporado en la cara apical (lumen) el compuesto fluorescente FITC-dextrán para analizar la permeabilidad aparente del intestino anterior (Foto: David Sánchez).

3.5. Análisis de datos y estadístico

Tras revisarse y confirmarse la normalidad y homocedasticidad de los datos obtenidos, las diferencias entre tratamientos se evaluaron usando el test paramétrico ANOVA de una vía (one-way ANOVA) en todos los casos. En aquellos parámetros donde se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (nivel de significación de p -valor < 0,05), se realizó el test de Tukey para su identificación. Todos los resultados se expresan como el valor medio de la variable \pm el error estándar de la media (EEM), y tanto los análisis estadísticos como la representación de estos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.).

4. RESULTADOS

4.1. Rendimiento productivo y parámetros biométricos

Todos los grupos experimentales mostraron un crecimiento alométrico desde 12-13 g hasta 37-39 g (**Figura 4.1a**), con una ganancia en peso (WG) del ~200% y tasas específicas de crecimiento (SGR) de 1,26-1,30% (**Tabla 4.1**). Además, la suplementación de la dieta redujo significativamente el consumo de pienso (**Figura 4.1b**), con el consecuente aumento de la eficiencia de alimentación desde un 0,81 (CTRL) hasta el 0,87-0,92 en los ejemplares alimentados con ambos compuestos (LB_{Gb} y LB_{Gh}) y niveles de inclusión (0,5 y 1%) (**Figura 4.1c**). Finalmente, no se observó mortalidad en ninguno de los grupos experimentales a lo largo de todo el periodo experimental.

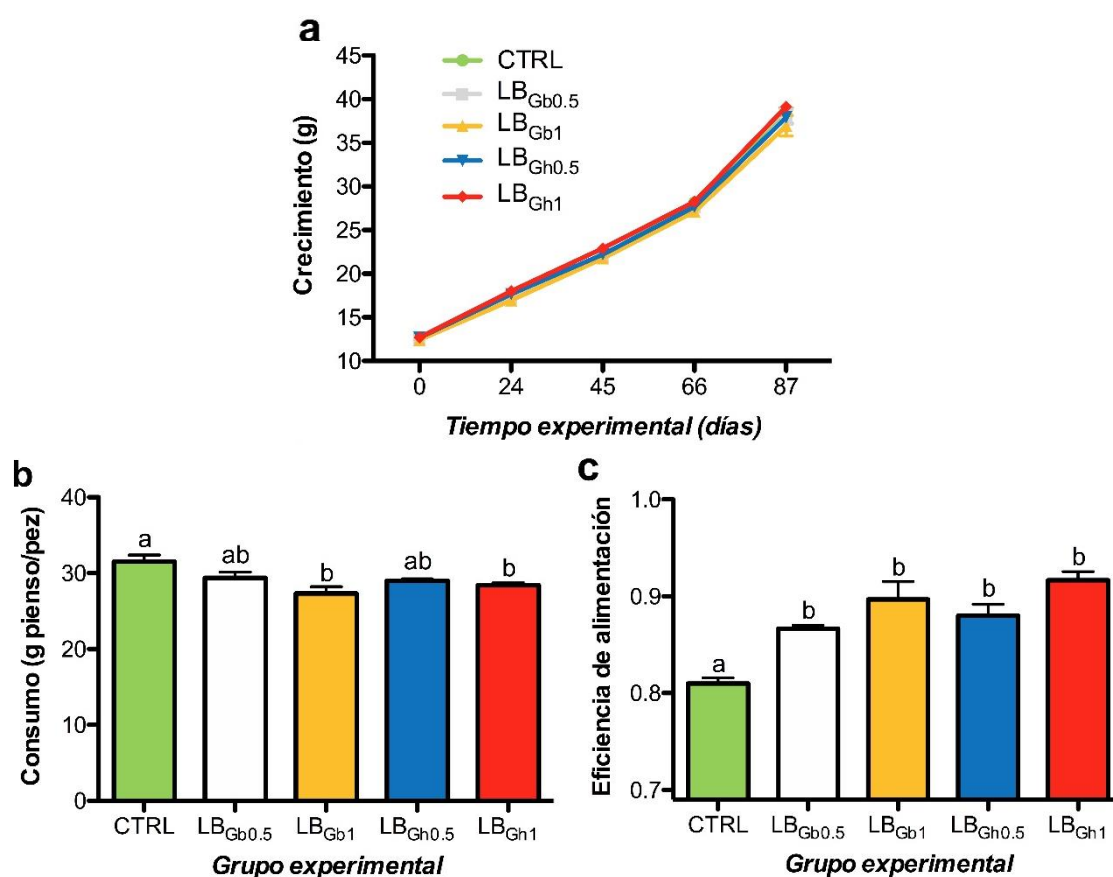


Figura 4.1. Evolución del crecimiento (a), índices de ingesta (b) y eficiencia de alimentación (c) en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 12 semanas con cinco dietas experimentales. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de los tanques triplicados para cada grupo experimental. Diferentes letras en cada grupo indican diferencias significativas entre tratamientos (one-way ANOVA, seguido del Test de Tukey; $p < 0,05$). CTRL: control; LB_{Gb0.5}: LB-GREENboost (0,5%); LB_{Gb1}: LB-GREENboost (1%); LB_{Gh0.5}: LB-GUThealth (0,5%); LB_{Gh1}: LB-GUThealth (1%).

Tabla 4.1. Parámetros de crecimiento e índices somáticos en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 12 semanas con cinco dietas experimentales. Los resultados sobre peso e índices de crecimiento (WG y SGR) se expresan como el promedio \pm EEM de los tanques triplicados para cada grupo experimental. Los datos de longitud e índices somáticos (CF y IHS) representan el promedio \pm EEM de 24 peces. Diferentes letras en cada grupo indican diferencias significativas entre tratamientos (one-way ANOVA, seguido del Test de Tukey; $p < 0,05$). CTRL: control; LB_{Gb0.5}: LB-GREENboost (0.5 %); LB_{Gb1}: LB-GREENboost (1 %); LB_{Gh0.5}: LB-GUThealth (0.5 %); LB_{Gh1}: LB-GUThealth (1 %).

| | CTRL | LB _{Gb0.5} | LB _{Gb1} | LB _{Gh0.5} | LB _{Gh1} | <i>p</i> |
|---------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------|
| Peso inicial (g) | 12,55 \pm 0,04 | 12,64 \pm 0,11 | 12,45 \pm 0,10 | 12,56 \pm 0,06 | 12,54 \pm 0,05 | 0,650 |
| Peso final (g) | 38,12 \pm 0,89 | 37,97 \pm 0,86 | 36,95 \pm 1,18 | 37,89 \pm 0,62 | 39,12 \pm 0,36 | 0,519 |
| Longitud final (cm) | 14,08 \pm 0,21 | 14,01 \pm 0,25 | 14,29 \pm 0,25 | 14,15 \pm 0,22 | 14,03 \pm 0,21 | 0,909 |
| CF | 1,32 \pm 0,05 | 1,30 \pm 0,02 | 1,30 \pm 1,02 | 1,34 \pm 0,04 | 1,30 \pm 0,02 | 0,835 |
| WG (%) | 203,8 \pm 6,8 | 200,5 \pm 4,4 | 196,8 \pm 8,3 | 199,2 \pm 5,8 | 208,1 \pm 2,5 | 0,703 |
| SGR (%) | 1,27 \pm 0,03 | 1,26 \pm 0,02 | 1,25 \pm 0,03 | 1,26 \pm 0,02 | 1,30 \pm 0,01 | 0,610 |
| IHS (%) | 1,01 \pm 0,05 ^a | 1,16 \pm 0,04 ^{ab} | 1,24 \pm 0,04 ^b | 1,10 \pm 0,07 ^a | 1,11 \pm 0,04 ^a | 0,037 |

4.2. Bienestar animal y metabolismo

Los niveles de cortisol plasmático disminuyeron significativamente en los animales alimentados con ambas dosis del compuesto LB_{Gb} , mientras que el compuesto LB_{Gh} produjo una tendencia clara en este mismo sentido, aunque no significativa, con una reducción del 30% con respecto al grupo control (**Figura 4.2**).

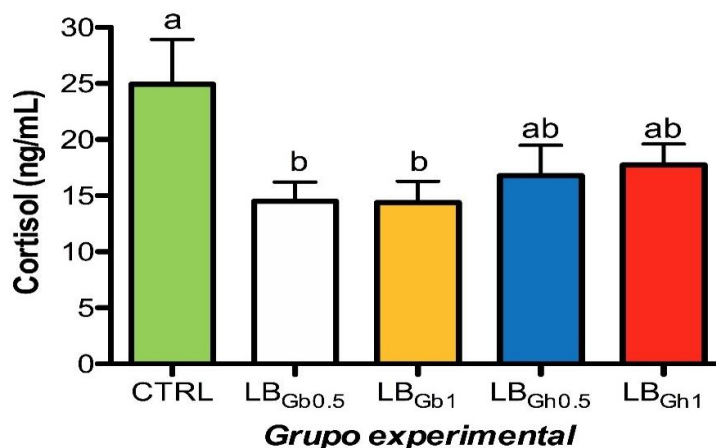


Figura 4.2. Concentración de cortisol plasmático en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 12 semanas con cinco dietas experimentales. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de 12 peces. Información complementaria similar a lo descrito en la Figura 4.1.

La **Tabla 4.2** muestra las modificaciones producidas metabólicamente, ya sea a nivel plasmático, hepático y/o muscular, tras la suplementación en la dieta. Los compuestos nutraceuticos no alteraron los niveles plasmáticos de glucosa y proteínas, aunque si produjeron una disminución de la concentración de lactato circulante en los animales alimentados con ambos niveles d inclusión del compuesto LB_{Gb} ($LB_{Gb0.5}$ y LB_{Gb1}), así como en aquellos alimentados con la dieta LB_{Gh1} . Sin embargo, los niveles de triglicéridos plasmáticos mostraron un aumento significativo y dosis-dependiente en animales alimentados con ambos compuestos. A nivel hepático, no se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa y triglicéridos, aunque el almacenamiento de glucógeno mostró un aumento significativo en animales alimentados con la dosis más alta de ambos compuestos (LB_{Gb1} y LB_{Gh1}) con respecto al grupo control no suplementado. Finalmente, en músculo, sólo los peces alimentados con la dieta LB_{Gh1} mostraron un aumento significativo en la acumulación de triglicéridos comparado a lo observado en el grupo control, no existiendo modificaciones producidas por la suplementación en el contenido de glucosa, glucógeno y lactato en este tejido.

Tabla 4.2. Parámetros metabólicos a nivel plasmático, hepático y muscular en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 13 semanas con cinco dietas experimentales. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de 12 peces. gpf: gramos de peso fresco del tejido. Información complementaria similar a lo descrito en la Tabla 3.1.

| | CTRL | LB _{Gb0.5} | LB _{Gb1} | LB _{Gh0.5} | LB _{Gh1} | <i>p</i> |
|---|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------|
| Glucosa plasmática (mM) | 3,32 \pm 0,08 | 3,36 \pm 0,10 | 3,59 \pm 0,12 | 3,42 \pm 0,11 | 3,34 \pm 0,10 | 0,385 |
| Lactato plasmático (mM) | 4,18 \pm 0,49 ^a | 2,26 \pm 0,2 ^b | 2,39 \pm 0,31 ^b | 2,79 \pm 0,34 ^{ab} | 1,91 \pm 0,18 ^b | 0,012 |
| Triglicéridos plasmáticos (mM) | 1,25 \pm 0,08 ^a | 1,49 \pm 0,17 ^{ab} | 1,83 \pm 0,14 ^b | 1,52 \pm 0,18 ^{ab} | 1,90 \pm 0,15 ^b | 0,032 |
| Proteínas plasmáticas (mg/mL) | 31,54 \pm 0,74 | 31,84 \pm 0,88 | 30,68 \pm 1,64 | 31,14 \pm 1,07 | 29,44 \pm 1,58 | 0,869 |
| Glucosa hepática (μ mol/gpf) | 0,67 \pm 0,09 | 0,82 \pm 0,11 | 0,62 \pm 0,14 | 1,03 \pm 0,17 | 0,67 \pm 1,11 | 0,178 |
| Glucógeno hepático (μ mol/gpf) | 3,86 \pm 0,34 ^a | 4,48 \pm 0,23 ^{ab} | 5,45 \pm 0,39 ^b | 4,10 \pm 0,27 ^a | 5,23 \pm 0,25 ^b | 0,001 |
| Triglicéridos hepáticos (μ mol/gpf) | 97,8 \pm 11,0 | 99,7 \pm 13,5 | 104,0 \pm 10,3 | 103,6 \pm 8,8 | 92,6 \pm 7,5 | 0,946 |
| Glucosa muscular (μ mol/gpf) | 0,19 \pm 0,03 | 0,19 \pm 0,04 | 0,17 \pm 0,03 | 0,17 \pm 0,03 | 0,19 \pm 0,05 | 0,977 |
| Glucógeno muscular (μ mol/gpf) | 0,04 \pm 0,02 | 0,07 \pm 0,03 | 0,09 \pm 0,03 | 0,09 \pm 0,04 | 0,04 \pm 0,01 | 0,136 |
| Lactato muscular (μ mol/gpf) | 41,64 \pm 2,57 | 49,12 \pm 2,22 | 45,22 \pm 2,63 | 47,98 \pm 3,32 | 45,01 \pm 2,57 | 0,330 |
| Triglicéridos musculares (μ mol/gpf) | 17,73 \pm 2,27 ^a | 19,84 \pm 2,83 ^a | 18,49 \pm 3,07 ^a | 24,01 \pm 4,02 ^{ab} | 34,13 \pm 5,56 ^b | 0,022 |

4.3. Fisiología intestinal

A nivel del tracto gastrointestinal, el índice de longitud del intestino (ILI) mostró un aumento significativo y dosis-dependiente, llegando a alcanzar un aumento del ~129 % y el ~135 % en los niveles de mayor nivel de suplementación (LB_{Gb1} y LB_{Gh1}, respectivamente) comparado con el grupo control no suplementado (~96 %) (**Figura 4.3a**). Esta misma tendencia fue igualmente observada para el caso de la resistencia epitelial (**Figura 4.3c**). Por su parte, la corriente de cortocircuito (Isc) no reveló diferencias significativas entre tratamientos, permaneciendo siempre con valores negativos (Isc<0), indicativo de la existencia de una función de absorción epitelial (**Figura 4.3b**). Finalmente, la permeabilidad aparente mostró un aumento igualmente dosis-dependiente en animales alimentados con ambos compuestos, aunque solo se registraron diferencias estadísticamente significativas en aquellos pertenecientes al grupo LB_{Gh1} (**Figura 4.3d**).

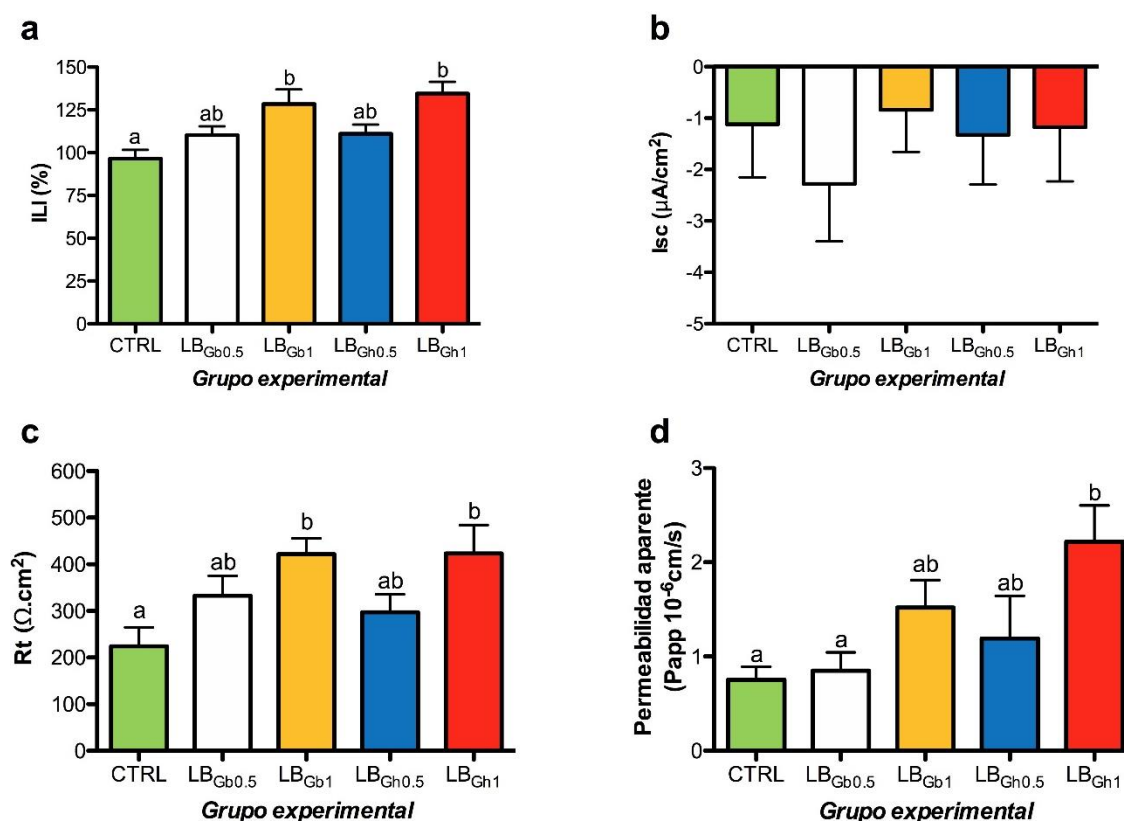


Figura 4.3. Parámetros de fisiología intestinal en relación con la longitud del intestino (ILI, **a**), corriente de cortocircuito (Isc, **b**), resistencia epitelial (Rt, **c**), y permeabilidad aparente (**d**) en juveniles de dorada (*S. aurata*) alimentados durante 12 semanas con cinco dietas experimentales. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM de 8 peces. Información complementaria similar a lo descrito en la Figura 4.1.

5. DISCUSIÓN

En el sector acuícola, el uso de las microalgas está muy extendido para el enriquecimientos de los cultivos auxiliares de zooplancton (sobre todo rotíferos y artemias) utilizados en la alimentación de los primeros estadios (desde el comienzo de la alimentación exógena hasta el destete), o usándose directamente en los tanques de cultivo larvario para conseguir el efecto “aguas verdes”, manteniendo así la calidad nutricional del zooplancton añadido para la alimentación de dichas larvas (Navarro y Sarasquete, 1998; Guedes y Malcata, 2012). Además, en la última década la introducción de las microalgas como compuesto de la formulación de piensos funcionales se están valorando como alternativa al uso de harinas y aceites de pescado, o al menos para su reemplazo parcial, por su alto contenido de proteínas y lípidos (López et al., 2010; Huerlimann et al., 2010), buscando mejorar la sostenibilidad medioambiental del sector. Uno de los principales inconvenientes de esta estrategia está siendo el alto coste de producción de la biomasa de microalgas (Camacho et al., 2019), aunque en la actualidad ya existen diferentes productos (*e.g.* AlgaPrime™ DHA) producidos a gran escala que se están utilizando comercialmente en la producción del salmón (Tocher et al., 2019). Sin embargo, también existe un interés creciente en el uso de microalgas como nutraceuticos en alimentos funcionales (Brown et al., 1999; Camacho et al., 2019), cuyos efectos pueden ejercerse a un bajo nivel de inclusión en la dieta. De esta forma, los productos basados en microalgas que han sido evaluados en este estudio (LB-GUThealth® y LB-GREENboost®) se incluyeron en una formulación próxima a la producida de forma comercial para alimentos acuícolas a niveles que pueden considerarse bajos (1%) o muy bajos (0,5%). Los resultados mostraron que incluso en el nivel de inclusión más bajo, estos productos producen cambios positivos en la eficiencia alimentaria, el metabolismo y la salud intestinal de los juveniles de dorada alimentados durante un periodo de 12 semanas.

Ambos compuestos a base de microalgas (LB_{Gb} o LB_{Gh}) no afectaron negativamente a la tasa específica de crecimiento (SGR), a la ganancia de peso (WG), ni a la supervivencia durante el periodo experimental (**Tabla 4.1**). Del mismo modo, en un experimento previo con larvas de dorada usando una combinación de microalgas

incluidas en el pienso tampoco afectó negativamente al crecimiento y supervivencia (Eryalçın y Yildiz, 2015). A pesar de ello, dichos compuestos redujeron la ingesta de alimento, lo que unido a unas tasas de crecimiento similares en todos los grupos experimentales implica un aumento de la eficiencia de alimentación (**Figura 4.1**). Por tanto, estos resultados nos indican que la incorporación de los productos nutraceuticos al pienso como compuestos activos en alimentos funcionales para la dorada puede reducir la cantidad de pienso necesaria para producir una tonelada de pescado de dicha especie, consiguiendo así disminuir los costes de producción aumentando la competitividad. En este sentido, la **Tabla 5.1** muestra el análisis de rendimiento productivo, con un rango de mejora en la eficiencia alimentaria del 7,4 al 13,5% con respecto al grupo control no suplementado, poniendo de manifiesto que la incorporación de estos productos en dietas funcionales podría suponer una reducción de hasta 148 kg de pienso por cada tonelada de ejemplares cultivados. De esta forma, y dado el bajo nivel de inclusión necesario (el 1 % máximo utilizado en este trabajo), así como su coste de producción razonable (20 €/kg de producto), su uso podría resultar en términos globales, en una doble vertiente de beneficios: i) una en relación a una reducción de los costes de producción de hasta 222 € por tonelada de peces producidos, aunque el balance económico dependa de la cantidad suplementada, además de ii) la importante componente medioambiental al reducir el uso de harinas y aceites de pescado, y todo ello siempre produciendo efectos positivos sobre el bienestar animal y metabolismo de los organismos cultivados.

Tabla 5.1. Estimación del uso de productos basados en compuestos de microalgas sobre el ahorro de alimentación y balance global de los costes de producción por tonelada de pescado producido. CTRL: control; LB_{Gb0.5}: LB-GREENboost (0.5 %); LB_{Gb1}: LB-GREENboost (1 %); LB_{Gh0.5}: LB-GUThealth (0.5 %); LB_{Gh1}: LB-GUThealth (1 %).

| | FE (kg peces/kg pienso) | Consumo total (kg pienso/ton peces) | Ahorro de pienso (kg pienso/ton peces) | Ahorro en costes (€/ton pienso) ¹ | Balance económico (€/ton pienso) |
|---------------------------|-------------------------------|---|--|--|--|
| CTRL | 0.81 | 1235 | | | |
| LB_{Gb0.5} | 0.87 | 1149 | 85 | 128 | 28 |
| LB_{Gb1} | 0.90 | 1111 | 123 | 185 | -15 |
| LB_{Gh0.5} | 0.88 | 1136 | 98 | 147 | 47 |
| LB_{Gh1} | 0.92 | 1087 | 148 | 221 | 21 |

¹ Para la estimación, se ha considerado un valor de 1,5 €/kg de pienso.

A partir de nuestros resultados, es evidente que estos efectos producidos tras la suplementación del pienso con productos basados en microalgas a nivel de eficiencia de alimentación se lograron mediante modificaciones y orquestación de diferentes procesos fisiológicos de los animales ensayados, tanto a nivel metabólico como de absorción intestinal. Ambos compuestos aumentaron la longitud del intestino y previsiblemente su capacidad de absorción, de manera dosis-dependiente, aunque los valores más elevados se localizaron en el grupo LB_{Gh1} (**Figura 4.3**). De la misma manera, tanto en otras especies marinas (Vizcaíno et al., 2018) como en la especie sujeta a este estudio, ya sea en alevines (Vizcaíno et al., 2016) o juveniles (Vizcaíno et al., 2014), la inclusión de diferentes microalgas en la dieta aumenta la superficie de absorción de los enterocitos, es decir, de las células epiteliales del intestino. Se sabe que el intestino tiene una plasticidad que le permite aumentar su longitud en respuesta a la sustitución de harinas y aceites de pescado por otras fuentes de origen vegetal, tal y como se ha demostrado anteriormente en esta especie (Santigosa et al., 2008; Perera et al., 2019), pero no se conocía dicha respuesta a niveles bajos (1%) o muy bajos (0,5%) de nutraceúticos derivados de microalgas, como en este estudio. A todo lo anteriormente expuesto, los resultados obtenidos de los análisis de electrofisiología y permeabilidad del intestino son sumamente importantes. En este sentido, se demuestra que la funcionalidad intestinal no sufre ninguna alteración debido a que los resultados de corriente de cortocircuito negativos ($I_{sc} < 0$) indican que el epitelio se encuentra en modo de absorción (**Figura 4.3b**). Además, de los datos obtenidos también se extrae que el proceso de absorción se esté dando para compuestos nutricionalmente válidos, no permitiendo la entrada de aquellos otros anti-nutricionales o no digeribles/metabolizables (fibra, celulosa de las paredes de las microalgas, entre otros), tal y como denota la mayor permeabilidad aparente del tejido con el aumento de la selectividad del mismo dada por la resistencia epitelial (R_t) (**Figura 4.3c y d**). Por tanto, nuestros resultados demuestran que el aumento de la eficiencia y aprovechamiento en la alimentación va a venir marcado por i) un aumento en la superficie de absorción producida por un mayor tiempo de residencia de los alimentos (mayor longitud), ii) una mejor selectividad del epitelio al paso de compuestos de valor nutricional (mayor resistencia y permeabilidad del intestino), y iii)

presumiblemente una mayor superficie de los enterocitos y/o longitud de los microvillis.

Por otro lado, el compuesto LB_{Gb} consiguió modificar el índice hepatosomático (IHS) (**Tabla 4.1**) y el nivel de cortisol en plasma (**Figura 4.2**), produciéndolo incluso en el nivel más bajo de inclusión (0,5%), lo que nos revela diferencias en los efectos producidos por ambos compuestos en el metabolismo. En condiciones de estrés se produce la activación de respuestas fisiológicas a nivel endocrino, conocidas como respuestas primarias, liberando catecolaminas y cortisol desde núcleos específicos del riñón cefálico (tejido cromafín e interrenal, respectivamente) hasta el torrente sanguíneo. Así, el cortisol juega un papel regulador clave en el metabolismo de diferentes órganos como el músculo, inhibiendo la síntesis de glucógeno (Kuo et al., 2013) e induciendo la movilización de glucosa y ácidos grasos para producir energía y superar el estímulo estresante (Mommensen et al 1999). En el hígado, el cortisol también induce cambios para hacer frente a la mayor demanda energética asociada con la exposición al estrés (Das et al., 2018), dado que este órgano puede considerarse como uno de los principales almacenamientos de reservas energéticas en teleósteos. Sin embargo, los niveles basales del cortisol en peces en condiciones no estresantes aún se desconocen (Jerez-Cepa et al., 2019). En este sentido, los niveles altos de cortisol provocan una mayor gasto energético y una menor tasa de crecimiento, niveles más altos de triglicéridos en el hígado y mayor catabolismo de aminoácidos y gluconeogénesis en el músculo (Jerez-Cepa et al., 2019). Por el contrario, niveles bajos de cortisol pueden estimular la síntesis de proteínas, y por tanto provocar crecimiento somático, así como la acumulación de glucógeno en el hígado y de lípidos en el músculo (Van Der Boon et al., 1991; Milligan et al., 2003; Jerez-Cepa et al., 2019). En este estudio, mediante la suplementación de productos derivados de microalgas en la dieta se ha mejorado la eficiencia alimenticia, consiguiendo un mayor almacenamiento de glucógeno hepático y mayores niveles de triglicéridos en el músculo en los peces alimentados con las dietas de mayor inclusión (1%), tanto LB_{Gb} y LB_{Gh} (**Tabla 4.2**). Se conoce que los ácidos grasos de la dieta juegan un papel importante en la regulación de la liberación de cortisol en los peces (*e.g.* Montero et al. 1998; Van Anholt et al., 2004; Ganga et al., 2006). Sin embargo, dado el bajo nivel de inclusión de LB_{Gb} en este

estudio, los efectos que puedan ejercer sobre los niveles de cortisol a través de este mecanismo no están claros, aunque se puede sugerir que las dosis más bajas de alimentación necesarias para lograr la saciedad aparente producen una disminución en la anticipación a la actividad que conduce a mejorar el estado de bienestar de los peces, lo que se refleja claramente en niveles más bajos de cortisol. No obstante, se desconoce si este efecto de disminución de los niveles de cortisol en plasma puedan ser también un reflejo de la posible respuesta de los peces ante condiciones estresantes en el cultivo, como pueden ser la alta densidad de población o el manejo, por lo que se hace necesario profundizar más en este tema en sucesivos estudios.

De igual modo, nuestros resultados también mostraron que ambos compuestos redujeron el nivel de lactato en plasma, aunque LB_{Gb} lo produjo con una inclusión más baja (0.5%) que en el caso de LB_{Gh} (1%). Este resultado puede sugerir que ambos productos favorecen el metabolismo oxidativo sobre el metabolismo anaeróbico en el músculo. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre tratamientos en el glucógeno, glucosa libre y lactato en el músculo, por lo que esta menor concentración de lactato circulante a partir del metabolismo anaeróbico muscular en los peces alimentados con ambas dietas suplementadas con microalgas parece no explicar al 100% esos resultados. Aun así, la explicación más adecuada puede ser que parte del lactato formado de manera basal sugiera su retirada mediante la estimulación de la absorción y eliminación de este metabolito por parte del hígado u otros tejidos para la producción de piruvato y su entrada en el Ciclo de Krebs para la producción de energía. (e.g. Dando, 1969; Milligan y Girard, 1993; Soengas y Aldegunde, 2002; Omlin et al., 2014). De esta forma, en los ejemplares alimentados con LB_{Gh} y LB_{Gb} al 1% se produjo un mayor almacenamiento hepático del glucógeno, lo que nos indica que ambos compuestos favorecen la absorción hepática del lactato. En cambio, los triglicéridos almacenados en el hígado no mostraron diferencias entre tratamientos, lo que nos revela que los triglicéridos sintetizados se exportan hacia otros lugares, de acuerdo con un mayor nivel de triglicéridos en plasma alimentados con el mayor nivel de inclusión (1%) de ambos productos (LB_{Gh} y LB_{Gb}). Esta sería también la causa del aumento de triglicéridos en el músculo del grupo LB_{Gh} al 1%, duplicando el contenido de este metabolito en el tejido muscular respecto al grupo control (**Tabla 4.2**). Dichos cambios

en el contenido de triglicéridos en el músculo de los peces alimentados con LB_{Gh} al 1% se pueden deber a modificaciones en la vía metabólica de otros nutrientes inducidos por este producto derivado de las microalgas. Por ejemplo, en dorada, se ha demostrado que entre el 22-30% de los lípidos depositados en los diferentes tejidos pueden proceder de proteínas de la dieta (Ekman et al., 2013).

Por lo tanto, y a modo de resumen, con este estudio se ha demostrado que el uso de LB_{Gh} y LB_{Gb} en las dietas de dorada (*S. aurata*) de formulación próxima a la comercial no afecta al crecimiento y mejora la eficiencia alimentaria. Se han logrado diferentes efectos positivos con el uso de dichos productos procedentes de microalgas con un bajo nivel de inclusión, como se ha hecho en el salmón con el 5% (Kousoulaki et al., 2016), en el cerdo 5-7% (Kalbe et al., 2019) y en pollos de engorde con el 0,1-0,2% (Yan y Kim, 2013). También se encontró que tanto LB_{Gh} y LB_{Gb} ejercieron efectos positivos tanto a nivel metabólico como en la funcionalidad intestinal y bienestar animal en los juveniles de dorada, aunque dichas mejoras se producen de forma diferentes o dosis-dependiente en función del nivel de inclusión (0,5-1%). Dado el bajo nivel de suplementación en la dieta y su coste razonable, el uso de estos productos daría como resultado un ahorro en el consumo de pienso por tonelada de peces de cultivo, y por tanto en los costes de producción, y una disminución en el impacto medioambiental al reducir la presión sobre las harinas y aceites de pescado. Aun así, sería aconsejable la realización de más estudios para aclarar si estos beneficios observados a nivel de experimentación, bajo condiciones controladas, pueden extenderse tanto a diferentes especies comerciales como a diferentes condiciones de cultivo (alta densidad poblacional o manejo). Del mismo modo, valdría la pena probar el potencial de estos productos para mejorar algunos de los efectos negativos del alto reemplazo de harinas y aceites de pescado en los alimentos de dorada, especialmente aquellos dirigidos al metabolismo intestinal y lipídico.

6. CONCLUSIONES

1. La suplementación con los compuestos nutraceuticos LB-GUThealth® y LB-GREENboost® en la dieta de dorada (*Sparus aurata*) de formulación próxima a la comercial no afectó al crecimiento de los animales alimentados durante 12 semanas, aunque sí mejoró la eficiencia alimentaria y los índices de conversión, incluso en el nivel más bajo de inclusión (0,5%).
2. Tanto LB-GUThealth® como LB-GREENboost® ejercen efectos positivos a nivel metabólico y de bienestar animal, principalmente marcados por menores niveles de lactato y cortisol a nivel plasmático, y a una re-distribución de los niveles circulantes y de almacenamiento de triglicéridos y/o glucógeno.
3. A nivel de funcionalidad intestinal, la suplementación de ambos compuestos produjo, de manera dosis-dependiente en función del nivel de inclusión (0,5% ó 1%), una elongación del tracto gastrointestinal, disponiendo de una mayor superficie de absorción que a su vez fue significativamente más selectiva y permeable.
4. A nivel económico, la incorporación de los compuestos nutraceuticos LB-GUThealth® como LB-GREENboost® a la dieta redujo la cantidad de pienso necesaria para producir una tonelada de dorada, disminuyendo de manera general los costes de producción y aumentando la competitividad en el sector de producción de aditivos funcionales.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APROMAR. (2019). *La acuicultura en España 2019*. Recuperado de <http://www.apromar.es/content/informes-anales>
- Audouin, J. (1962). La daurade de l'étang de Thau *Chrysophrys aurata* (Linné). *Revue Des Travaux de l'Institut Des Peches Maritimes*, 26(1), 105–126.
- Benedito-Palos, L., Ballester-Lozano, G. F., Simó, P., Karalazos, V., Ortiz, Á., Calduch-Giner, J., & Pérez-Sánchez, J. (2016). Lasting effects of butyrate and low FM/FO diets on growth performance, blood haematology/biochemistry and molecular growth-related markers in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 454, 8-18. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.12.008.
- Bonaldo, A., Isani, G., Fontanillas, R., Parma, L., Grilli, E. & Gatta, P.P. (2010). Growth and feed utilization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fed to satiation and restrictively at increasing dietary energy levels. *Aquaculture International*, 18, 909–919. doi:10.1007/s10499-009-9312-0.
- Borja, Á. (2002). Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* (Vol. 18, pp. 41–49).
- Brown, M. R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C., & Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11(3), 247-255. doi:10.1023/A:1008075903578.
- Burr, G., Gatlin III, D., & Ricke, S. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture society*, 36(4), 425-436. doi:10.1111/j.1749-7345.2005.tb00390.x.
- Camacho, F., Macedo, A. & Malcata, F. (2019). Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: a short review. *Marine Drugs* 17, E312. doi:10.3390/md17060312.
- Chakraborty, S. B. & Hancz, C. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Reviews*

- in Aquaculture*, 3(3), 103-119. doi:10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x.
- Dando, P. R. (1969). Lactate metabolism in fish. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 49(1), 209-223. doi:10.1017/S002531540004652X.
- Das, C., Thraya, M., & Vijayan, M. M. (2018). Nongenomic cortisol signaling in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 265, 121-127. doi:10.1016/j.ygcen.2018.04.019.
- Ekmann, K. S., Dalsgaard, J., Holm, J., Campbell, P. J., & Skov, P. V. (2013). Effects of dietary energy density and digestible protein: energy ratio on de novo lipid synthesis from dietary protein in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) quantified with stable isotopes. *British Journal of Nutrition*, 110(10), 1771-1781. doi:10.1017/S0007114513001281.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø., & Martins, C. I. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 163-188. doi: 10.1007/s10695-011-9568-y.
- Eryalçın, K. M., Roo, J., Saleh, R., Atalah, E., Benítez, T., Betancor, M., ... & Izquierdo, M. (2013). Fish oil replacement by different microalgal products in microdiets for early weaning of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*, 44(5), 819-828. doi:10.1111/j.1365-2109.2012.03237.x.
- Eryalçın, K. M. & Yildiz, M. (2015). Effects of long-term feeding with dried microalgae added microdiets on growth and fatty acid composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15(4), 899-909 doi:10.4194/1303-2712-v15_4_14.
- Estensoro, I., Ballester-Lozano, G., Benedito-Palos, L., Grammes, F., Martos-Sitcha, J. A., Mydland, L. T., ... & Øverland, M. (2016). Dietary butyrate helps to restore the intestinal status of a marine teleost (*Sparus aurata*) fed extreme diets low in fish meal and fish oil. *Plos One*, 11(11). doi: 10.1371/journal.pone.0166564.
- FAO. (2018). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/i9540es/i9540es.pdf>

- Fundación Observatorio Español de Acuicultura. (2014). *Plan Estratégico Plurianual de la Acuicultura Española 2014-2020*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Ganga, R., Tort, L., Acerete, L., Montero, D. & Izquierdo, M. S. (2006). Modulation of ACTH-induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interrenal cells from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Journal of Endocrinology*, 190, 39-45. doi:10.1677/joe.1.06770.
- Gong, Y., Bandara, T., Huntley, M., Johnson, Z. I., Dias, J., Dahle, D., ... & Kiron, V. (2019). Microalgae *Scenedesmus sp.* as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 501, 455-464. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.11.049.
- Gregório, S. F., Carvalho, E. S. M., Encarnação, S., Wilson, J. M., Power, D. M., Canário, A. V. M., & Fuentes, J. (2013). Adaptation to different salinities exposes functional specialization in the intestine of the sea bream (*Sparus aurata* L.). *Journal of Experimental Biology*, 216(3), 470–479. doi:10.1242/jeb.073742.
- Guedes, A. C. & Malcata, F. X. (2012). Nutritional value and uses of microalgae in aquaculture. *Aquaculture*, 10(1516), 59-78. Dr. Zainal Muchlisin (Ed.), ISBN: 978-953-307-974-5, InTech. Disponible en <http://www.intechopen.com/books/aquaculture/nutritional-value-and-uses-of-microalgae-in-aquaculture>
- Hasan, M.R. & Soto, S. 2017. *Improving feed conversion ratio and its impact on reducing greenhouse gas emissions in aquaculture*. Rome: FAO Non-Serial Publication. 33 pp.
- He, Y., Lin, G., Rao, X., Chen, L., Jian, H., Wang, M., ... & Chen, B. (2018). Microalga *Isochrysis galbana* in feed for *Trachinotus ovatus*: effect on growth performance and fatty acid composition of fish fillet and liver. *Aquaculture International*, 26(5), 1261-1280. doi: 10.1007/s10499-018-0282-y.
- Huerlimann, R., De Nys, R., & Heimann, K. (2010). Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up

- production. *Biotechnology and bioengineering*, 107(2), 245-257. doi:10.1002/bit.22809.
- ILSI. (1999). *Food Component Report*. Washington DC, USA: ILSI Press.
- Ivanova, A., Micheline, M., Olvera, C., Monteforte-sánchez, M., Ramírez, E. A. & Domínguez, W. (2017). La economía azul como modelo de sustentabilidad para estados costeros: el caso de Baja California Sur. *Sociedad y Ambiente*, 5(14), 75-98. doi:10.31840/sya.v0i14.1768.
- Jensen, L. B., Provan, F., Larssen, E., Bron J. E., & Obach A. (2015). Reducing sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L) through functional feeds. *Aquaculture Nutrition*, 21(6), 983-993. doi:10.1111/anu.12222.
- Jerez-Cepa, I., Gorissen, M., Mancera, J. M., & Ruiz-Jarabo, I. (2019). What can we learn from glucocorticoid administration in fish? Effects of cortisol and dexamethasone on intermediary metabolism of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 231, 1-10. doi:10.1016/j.cbpa.2019.01.010.
- Kalbe, C., Priepke, A., Nürnberg, G., & Dannenberger, D. (2019). Effects of long-term microalgae supplementation on muscle microstructure, meat quality and fatty acid composition in growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(2), 574-582. doi:10.1111/jpn.13037.
- Keppler D, & Decker K. (1974). *Glycogen determination with amyloglucosidase*. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic press, pp 1127–1131.
- Kiron, V., Sørensen, M., Huntley, M., Vasanth, G. K., Gong, Y., Dahle, D., & Paliawadana, A. M. (2016). Defatted biomass of the microalga, *Desmodesmus* sp., can replace fishmeal in the feeds for Atlantic salmon. *Frontiers in Marine Science*, 3, 67. doi:10.3389/fmars.2016.00067.
- Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R. K., & Sweetman, J. (2016). Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in

- Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 451, 47-57. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.027.
- Kumar, M. H., Gajaria, S. C., & Radha, K. S. (2004). Growth and development of catla (*Catla catla*) fed with different levels of diet containing *Spirogyra* sp. *Bioresource Technology*, 95(1), 73-76. doi:10.1016/j.biortech.2004.02.004.
- Kuo, T., Harris, C. A., & Wang, J. C. (2013). Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 380(1-2), 79-88. doi:10.1016/j.mce.2013.03.003.
- López, C. V. G., García, M. D. C. C., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, J. M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587-7591. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.077.
- Martos-Sitcha, J. A., Wunderink, Y. S., Straatjes, J., Skrzynska, A. K., Mancera, J. M., & Martínez-Rodríguez, G. (2014). Different stressors induce differential responses of the CRH-stress system in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 177, 49-61. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.07.021.
- Martos-Sitcha, J. A., Simó-Mirabet, P., Piazzon, M. C., de las Heras, V., Calduch-Giner, J. A., Puyalto, M., ... & Pérez-Sánchez, J. (2018). Dietary sodium heptanoate helps to improve feed efficiency, growth hormone status and swimming performance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition*, 24(6), 1638-1651. doi:10.1111/anu.12799.
- Martos-Sitcha, J. A., Simó-Mirabet, P., de Las Heras, V., Calduch-Giner, J. À., & Pérez-Sánchez, J. (2019). Tissue-specific orchestration of Gilthead Sea bream resilience to hypoxia and high stocking density. *Frontiers in Physiology*, 10, 840. doi:10.3389/fphys.2019.00840.
- Messina, M., Sánchez-Gurmaches, J., Navarro, I., Gutierrez, J., Bertotto, D., Tibaldi, E., & Tulli, F. (2014). Feeding Frequency Differently Affects Post Prandial Patterns of Plasma Glucose, Insulin and Insulin-like Growth Factor I in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(4),

921-928. doi:10.4194/1303-2712-v14_4_11.

Millán-Cubillo, A. F., Martos-Sitcha, J. A., Ruiz-Jarabo, I., Cárdenas, S., & Mancera, J. M. (2016). Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*, 451, 87–92. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.034.

Milligan, C. L., & Girard, S. S. (1993). Lactate metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 180(1), 175-193.

Milligan, C. L. (2003). A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. *Journal of Experimental Biology*, 206(18), 3167-3173. doi:10.1242/jeb.00538.

Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), 211-268. doi:10.1023/A:1008924418720.

Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M. S., Robaina, L., & Vergara, J. M. (1998). Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α -tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18(4), 399-407. doi:10.1023/A:1007734720630.

Mourete, G., Good, J. E., & Bell, J. G. (2005). Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquaculture nutrition*, 11(1), 25-40. doi:10.1016/j.cbpb.2006.08.012.

Naciones Unidas, (2017). Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, División de Población. World Population Prospects: La revisión de 2017, datos personalizados adquiridos a través del sitio web.

Navarro, N., & Sarasquete, C. (1998). Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae: I. Growth, histology and water quality. *Aquaculture*, 167(3-4), 179-193. doi:10.1016/S0044-8486(98)00311-1.

- Olvera-Novoa, M. A., Dominguez-Cen, I. J., Olivera Castillo, L. & Martinez-Palacios, C. A. (1998). Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. *Aquaculture Research*, 29(10), 709-715. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.29100709.x.
- Omlin, T., Langevin, K., & Weber, J. M. (2014). Exogenous lactate supply affects lactate kinetics of rainbow trout, not swimming performance. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(8), R1018-R1024. doi:10.1152/ajpregu.00200.2014.
- Ortega, A. (2008). *Cultivo de Dorada (Sparus aurata)*. Colección Cuadernos de Acuicultura, nº 1. FOESA, CSIC y MARM. Madrid. 44 pp.
- Palmegiano, G. B., Gai, F., Gasco, L., Lembo, G., Spedicato, M. T., Trotta, P., & Zoccarato, I. (2009). Partial replacement of fish meal by T-Iso in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles diets. *Italian Journal of Animal Science*, 8(sup2), 869-871. doi:10.4081/ijas.2009.s2.869.
- Papaharisis, L. & Avdelas, L. (2015). A method to benchmark farmed sea bream batches efficiency. XXII EAFE (European Association of Fisheries Economists) Conference. Salerno (Italy) – April 28–30, 2015.
- Pavlidis, M. A., & Mylonas, C. C. (Eds.). (2011). *Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*. Wiley-Blackwell, Oxford. Uk. 390 pp.
- Perera, E., Simó-Mirabet, P., Shin, H. S., Rosell-Moll, E., Naya-Catalá, F., de las Heras, V., ... & Chaves, E. (2019). Selection for growth is associated in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) with diet flexibility, changes in growth patterns and higher intestine plasticity. *Aquaculture*, 507, 349-360. doi:10.1016/j.aquaculture.2019.04.052.
- Reig, A. C. (2001). *Influencia de la temperatura y la salinidad sobre el crecimiento y consumo de oxígeno de la dorada (Sparus aurata L.)* (Tesis Doctoral). Universitat de Barcelona. Disponible en <http://hdl.handle.net/2445/35876>
- Saccol, E. M. H., Parrado-Sanabria, Y. A., Gagliardi, L., Jerez-Cepa, I., Mourão, R. H. V.,

- Heinzmann, B. M., ... & Martos-Sitcha, J. A. (2018). Myrcia sylvatica essential oil in the diet of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) attenuates the stress response induced by high stocking density. *Aquaculture nutrition*, 24(5), 1381-1392. doi:10.1111/anu.12675.
- Salama, A. J. (2008). Effects of different feeding frequency on the growth, survival and feed conversion ratio of the Asian sea bass *Lates calcarifer* juveniles reared under hypersaline seawater of the Red Sea. *Aquaculture Research*, 39(6), 561–567. doi:10.1111/j.1365-2109.2007.01890.x.
- Sánchez-Ruiz, D. (2018). *Efecto de la frecuencia de alimentación en el cultivo de doradas y su consecuencia en comunidades dominadas por angiospermas marinas*. (Tesis de Grado). Universidad de Cádiz, Puerto Real. Disponible en <http://hdl.handle.net/10498/20993>
- Santigosa, E., Sánchez, J., Medale, F., Kaushik, S., Pérez-Sánchez, J. & Gallardo M. A. (2008). Modifications of digestive enzymes in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bream (*Sparus aurata*) in response to dietary fish meal replacement by plant protein sources. *Aquaculture*, 282, 68-74. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.06.007.
- Sarker, P. K., Kapuscinski, A. R., Lanois, A. J., Livesey, E. D., Bernhard, K. P., & Coley, M. L. (2016). Towards sustainable aquafeeds: complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PloS One*, 11(6). doi:10.1371/journal.pone.0156684.
- Simó-Mirabet, P., Felip, A., Estensoro, I., Martos-Sitcha, J. A., de las Heras, V., Calduch-Giner, J., ... & Pérez-Sánchez, J. (2018). Impact of low fish meal and fish oil diets on the performance, sex steroid profile and male-female sex reversal of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) over a three-year production cycle. *Aquaculture*, 490, 64-74. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.02.025.
- Soengas, J. L., & Aldegunde, M. (2002). Energy metabolism of fish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(3), 271-296. doi:10.1016/s1096-4959(02)00022-2.

- Sørensen, M., Berge, G. M., Reitan, K. I., & Ruyter, B. (2016). Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*, *460*, 116-123. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.04.010.
- Sprague, M., Betancor, M. B., & Tocher, D. R. (2017). Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnology letters*, *39*(11), 1599-1609. doi:10.1007/s10529-017-2402-6.
- Sun, G., Liu, Y., Qiu, D., Yi, M., Li, X., & Li, Y. (2016). Effects of feeding rate and frequency on growth performance, digestion and nutrients balances of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in recirculating aquaculture systems (RAS). *Aquaculture Research*, *47*(1), 176–188. doi:10.1111/are.12480.
- Tocher, D. R., Betancor, M. B., Sprague, M., Olsen, R. E., & Napier, J. A. (2019). Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: Bridging the gap between supply and demand. *Nutrients*, *11*(1), 89. doi:10.3390/nu11010089.
- Van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Koven, W. M., Nixon, O., & Bonga, S. W. (2004). Arachidonic acid reduces the stress response of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Journal of Experimental Biology*, *207*(19), 3419-3430. doi:10.1242/jeb.01166.
- Van Der Boon, J., Van Den Thillart, G. E. & Addink, A. D. (1991). The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *100*(1), 47-53.
- Verdiell-Cubedo, D., Oliva-Paterna, F. J., & Torralva-Forero, M. (2007). Fish assemblages associated with *Cymodocea nodosa* and *Caulerpa prolifera* meadows in the shallow areas of the Mar Menor coastal lagoon. *limnetica*, *26*(2), 341-350.
- Vergara, J. M., Haroun, R., González, N., Molina, L., Briz, O., Boyra, A., ... & Ballesta, A. (2005). *Evaluación de Impacto Ambiental de Acuicultura en Jaulas en Canarias*. (Eds. Vergara, J.M., Haroun, R. y González, N.) Oceanográfica, Telde. ISBN:84- 609-4073-X. 110 pp.
- Vizcaíno, A. J., López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., ... & Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal

- alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431, 34-43 doi:10.1016/j.aquaculture.2014.05.010.
- Vizcaíno, A. J., Sáez, M. I., López, G., Arizcun, M., Abellán, E., Martínez, T. F., ... & Alarcón, F. J. (2016). *Tetraselmis suecia* and *Tisochrysis lutea* meal as dietary ingredients for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fry. *Journal of applied phycology*, 28(5), 2843-2855. doi:10.1007/s10811-016-0845-0.
- Vizcaíno, A. J., Rodiles, A., López, G., Sáez, M. I., Herrera, M., Hachero, I., ... & Alarcón, F. J. (2018). Growth performance, body composition, and digestive functionality of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles fed diets including microalgae freeze-dried biomass. *Fish physiology and biochemistry*, 44(2), 661-677. doi:10.1007/s10695-018-0462-8.
- Yan, L., & Kim, I. H. (2013). Effects of dietary ω -3 fatty acid-enriched microalgae supplementation on growth performance, blood profiles, meat quality, and fatty acid composition of meat in broilers. *Journal of applied animal research*, 41(4), 392-397. doi:10.1080/09712119.2013.787361.
- Zohar Y., Harel M., Hassin S. & Tandler A. (1995): *Gilthead sea bream (Sparus aurata)*. 94–117. In: Bromage N.R. & Roberts R.J. (eds.): *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Institute of Aquaculture. Blackwell Science. Oxford, UK. 432 pp.